

# La diagnosi dell'iperandrogenismo: il quesito del clinico e la risposta del laboratorio

V.A. Giagulli<sup>ab</sup>, A. Fortunato<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Dipartimento di Medicina Interna, U.O. di Malattie Metaboliche e Diabetologia, P.P.OO. Conversano-Monopoli, ASL BA, Conversano (BA)

<sup>b</sup>U.O. di Fisiopatologia della Riproduzione IRCCS, Castellana Grotte (BA)

<sup>c</sup>Dipartimento di Patologia Clinica, Laboratorio di Chimica Clinica ed Ematologia, Ospedale "San Bortolo", Vicenza

## Riassunto

Gli androgeni sono steroidi in grado di differenziare, sviluppare e mantenere i caratteri primari e secondari maschili. Inoltre, il testosterone (T) ha importanti effetti metabolici sulle proteine, lipidi e carboidrati. L'iperandrogenismo si caratterizza dalle manifestazioni cliniche dell'eccesso di androgeni.

Nel maschio l'iperandrogenismo è meno frequente che nella donna. Quando si riscontra durante la pubertà maschile come per esempio a causa di testotossicosi, iperplasia congenita surrenalica, neoplasie della Cellula del Leydig, ecc, si manifesta con pseudopubertà precoce. Tuttavia, l'iperandrogenemia (elevati livelli sierici di T e/o FT) non sempre determina l'iperandrogenismo. Questo può essere la conseguenza sia del fatto che gli androgeni circolanti possono essere poco attivi sia per aumento delle quote di androgeni attivi legate alla proteine come si verifica nell'ipertiroidismo o nella parziale o completa resistenza dei tessuti periferici agli androgeni circolanti. In quest'ultimo caso nel maschio si ha il quadro clinico di pseudoermafroditismo.

Nelle donne clinicamente l'iperandrogenismo si divide in due forme: quella minore (acne, alopecia, basso grado di irsutismo) e quella maggiore (virilismo). L'irsutismo è lo sviluppo di peli terminali con pattern di tipo maschile, mentre il virilismo si caratterizza da defeminizzazione con mascolinizzazione (voce baritonale, disposizione del grasso corporeo di tipo maschile, aumento della massa muscolare, calvizie di tipo maschile e ipertrofia clitoridea).

L'iperandrogenismo nella donna è legato a ipersecrezione ovarica e/o surrenalica degli androgeni (forma non classica dell'iperplasia surrenalica, sindrome

dell'ovaio policistico, tumori ovarici o surrenalici, ecc.) o ad aumentata sensibilità dei tessuti periferici a normali livelli plasmatici di androgeni. Tuttavia, le due condizioni spesso coesistono.

Il T è l'androgeno biologicamente più attivo che può essere trasformato in DHT ad opera della 5 $\alpha$  reduttasi nei tessuti sensibili. Sia T che DHT si legano al recettore androgenico. L'androgeno quantitativamente più importante è il DHEAS che origina quasi esclusivamente dal surrene. La sua attività androgenica si esplica solo dopo che viene trasformato in T e, in particolare nelle donne, il metabolismo periferico del DHEA(S) potrebbe essere la causa maggiore dell'irsutismo.

La valutazione biochimica dell'iperandrogenismo prevede la determinazione dei livelli plasmatici degli androgeni. Tuttavia, si deve ricordare che i livelli circolanti sono solo un parametro imperfetto dell'attività androgenica, in quanto non si evidenziano tutti gli eventi attivanti, inibenti e postrecettoriali che modulano l'effetto androgenico a livello del recettore cellulare. Pertanto, attualmente non si dispone di un utile ed attendibile parametro dell'effetto androgenico.

Un altro problema è la determinazione dei livelli plasmatici degli androgeni e, in particolar modo, del T. I Kits attualmente disponibili in commercio hanno una sensibilità sufficiente per la diagnosi dell'ipogonadismo maschile. Inoltre, i valori normali variano da laboratorio a laboratorio e, pertanto, uno dovrebbe conoscere i valori di riferimento del laboratorio per interpretare il dato clinico. Tuttavia, il problema è ancora più importante quando si vuole misurare i livelli circolanti del T nelle donne in quanto la sensi-

bilità per la determinazione del T dei kits attualmente in commercio è insufficiente rispetto ai reali livelli plasmatici di T presenti nelle donne.

Nella donna è stato proposto che i livelli plasmatici del  $3\alpha$ - $5\alpha$  androstanediolo glucuronide (ADG) possano riflettere l'attività androgenica totale. Tuttavia, poiché il maggior precursore dell'ADG è il DHEA(S) mentre il T (e l'androstenedione) contribuiscono in piccola parte ai suoi livelli plasmatici, e poiché l'ADG circolante origina prevalentemente dal fegato più che dai tessuti periferici, per tutti questi motivi l'ADG plasmatico non può essere ritenuto il marker dell'effetto androgenico a livello dei tessuti sensibili.

Gli effetti genomici del T sono indotti dopo diffusione passiva nelle cellule e dopo l'interazione dello ste-

roide con il recettore androgenico. Solo la quota free e non specificamente legata alle proteine può passivamente diffondere nelle cellule e, durante il transito nei capillari, solo la frazione legata alla albumina si dissocia ma non quella legata alla SHBG. Di qui l'interesse alla determinazione della quota free del T che può essere misurata tramite la dialisi o, praticamente, calcolata conoscendo i livelli circolanti della SHBG, del T e della albumina. Questo è prevalentemente indicato nei casi dove la quota di T legata a SHBG è modificata come per esempio nell'ipertiroidismo, obesità con riduzione della SHBG o dopo terapie con estrogeni (contraccettivi), ormoni tiroidei o antiepilettici (aumento della SHBG).

## Summary

### Hyperandrogenism diagnosis: from clinical questions to laboratory replies

Androgens are steroid hormones able to differentiate, develop and maintain primary and secondary male sexual characteristics. Moreover, Testosterone (T) presents important metabolic effects on protein, lipid and carbohydrate metabolism. Hyperandrogenism represents the clinical condition induced by excessive androgens.

In men, this clinical condition is less frequent than in women and, when it starts before puberty in the event of testotoxicosis, congenital adrenal hyperplasia, Cell Leydig tumors, etc, can bring about pseudopubertax praecox.

Hyperandrogenemia (elevated serum T and/or FT) does not necessarily induce hyperandrogenism, a consequence of the fact that the androgens in plasma may be relatively inactive, a consequence of increased protein binding for example in hyperthyroidism, or a consequence of partial or complete androgen resistance of peripheral tissues, the latter yielding pseudoermafroditism.

As to hyperandrogenism in women, we distinguishes clinically the minor forms (acne; low grade hirsutism) from the major forms (virilism). Hirsutism is the development of male pattern body hair growth, whereas virilism is characterized by defeminization and body masculinization (deepening of the voice, increased muscle mass, temporal balding, and clitoral enlargement). Hyperandrogenism in women finds its origin on either androgen hypersecretion by ovary and/or adrenal glands (non classical adrenal hyperplasia, polycystic ovary syndrome, adrenal or ovary tumors, etc) or in target tissues hypersensitivity to normal plasma levels of androgens (peripheral hirsutism). However, both conditions often coexist.

Biologically the most active androgen is T which in peripheral tissues is partially transformed to DHT, under the influence of the  $5\alpha$  reductase, and interacts with the androgen receptor. Quantitatively the most important androgen is DHEAS which originates almost exclusively from the adrenals. Its biological activity is mediated by its transformation to T in peripheral tissues and in women, this

peripheral transformation of DHEA(S) might be the major cause of hirsutism.

The biochemical exploration of hyperandrogenism involves the measurement of plasma androgens. It should however be realized that plasma levels are only an imperfect parameter of androgen activity, as activators, inhibitors and postreceptor events modulate cellular androgen activity. Unfortunately, no clinically useful sensitive parameter of androgen activity is available for the moment.

Another problem constitutes the measurement of plasma androgens, more specifically T. Whereas for the measurement of T in males, available commercial kits have the required sensitivity to measure even in hypogonadal males, it should be realized that nevertheless "normal" values vary between laboratories: hence in order to interpret correctly the values (mainly in borderline hypogonadism) one should know the normal range of values for that specific laboratory. The problem is even more crucial in act most commercial kits lack the required sensitivity to measure reliably plasma T levels.

It has been suggested that plasma levels of  $3\alpha$ - $5\alpha$  androstanediol glucuronide (ADG), might reflect total androgen activity. However, by far the major precursor of ADG is DHEA(S), T (and androstenedione) contributing only weakly to plasma ADG, which, moreover originates not only from peripheral tissues, but to a large extent is formed in the liver, fraction which does not reflect androgenicity.

The genomic effects of T are mediated after interaction with the androgen receptor after passive diffusion into the cell. Only free, non specific protein bound T can diffuse passively into the cell and, during the tissues transit time, albumin bound T dissociates but SHBG bound T does not: hence the interest to measure FT, which can be measured by dialysis or, more practically calculated knowing T, SHBG and albumin concentration. This is mainly indicated in cases where T binding is modified for ex. in dysthyroidism, obesity with decreased SHBG or after therapy such as estrogen (contraceptive pill), thyroid hormone or antiepileptics (increasing SHBG).

## Introduzione

La definizione degli androgeni include sia gli effetti sessuali (differenziazione e sviluppo dei caratteri sessuali primitivi e secondari maschili con sviluppo e mantenimento della fertilità, delle masse muscolari e dell'osso) che quelli metabolici sulle proteine, lipidi e carboidrati. È evidente che gli effetti si manifestano in ambo i generi, anche se con differenti caratteristiche. Sebbene il ruolo fisiologico degli androgeni nelle donne non sia completamente noto, le donne affette da iperandrogenismo presentano caratteristici segni dell'eccesso di androgeni come l'acne, l'alopecia e l'irsutismo. Inoltre, se l'esposizione agli androgeni è prolungata e i livelli circolanti sono seriamente elevati, si può riscontrare virilismo cioè aumento della massa muscolare, distribuzione maschile del grasso corporeo, mascolinizzazione della voce, ipertrofia clitoridea, ecc.

Gli effetti metabolici degli androgeni possono giustificare le numerose evidenze che sottolineano l'associazione tra l'ipogonadismo nel maschio e l'iperandrogenismo nella donna e l'obesità viscerale, l'insulino-resistenza, l'aumento dei livelli circolanti di LDL e di trigliceridi e la riduzione dei livelli di HDL con aumento del PAI 1 plasmatico.

L'androgeno di gran lunga più efficace è il testosterone (T), tuttavia gli effetti sui genitali, sulla prostata, sulle vescichette seminali e sulla cute sono mediati dal suo metabolita  $5\alpha$  ridotto diidrotosterone (DHT). Gli effetti sulla spermatogenesi e quelli metabolici sul tessuto adiposo e sul muscolo sono mediati dal T. Questo è possibile perché T e DHT sono in grado di legarsi direttamente al loro recettore specifico (androgeni forti). Quegli androgeni che non sono in grado di legarsi al loro recettore (androstenedione (A), deidroepiandrosterone (DHEA) e il suo solfato (DHEAS) sono definiti deboli, anche se possono essere metabolizzati a livello dei tessuti sensibili in T e DHT<sup>1</sup>.

## Fisiopatologia degli androgeni

Nell'uomo il T circolante origina esclusivamente dal testicolo, variando la secrezione giornaliera tra 4 e 8 mg. I suoi livelli circolanti alle prime ore del giorno nei giovani maschi (20-40 anni) variano tra 11,1-34,9 nmol/L (320-1000 ng/dl). Il T circola nel sangue legato strettamente per circa 50% a una specifica proteina nota come Sex hormone binding globulin (SHBG), debolmente per circa 40-50% all'albumina (Alb-T) e solo 1-2% circola libero (FT). La quota debolmente legata all'albumina più quella libera (FT) sono considerate la frazione biologicamente attiva del T (Bio-T) cioè quella disponibile a diffondere dal torrente circolatorio nelle cellule e a legarsi al recettore citoplasmatico degli androgeni<sup>2</sup>. Recenti evidenze dimostrano una attività non genomica del T tramite legame della quota SHBG-T a recettori di membrana (via proteine G e complesso AMP ciclico); tuttavia il significato biologico di questi effetti non genomici resta ancora poco noto. A dimostrazione del fatto che la frazione SHBG-T non è biologicamente attiva vi sono tutte quelle condizioni cliniche (per esempio l'ipertiroidismo) di aumento primitivo dei livelli plasmatici della SHBG che comportano un aumento dei livelli serici del T senza aumento della quota FT e, quindi, senza aumento di effetti degli androgeni<sup>2</sup>. Questo è possibile quando la sensibilità tissutale e, soprattutto, quella ipotalamo-ipofisaria agli androgeni circolanti è conservata in

quanto l'ipotalamo può controbilanciare le variazioni dei livelli plasmatici del T dovuti a variazioni primitive delle concentrazioni della SHBG con la secrezione di LH. Al contrario, quando ci sono difetti del feedback dell'asse ipotalamo-ipofisi-testicolo, le variazioni della SHBG, di T e FT non vengono riconosciute dall'ipotalamo e quindi non vi è un'adeguata risposta della secrezione ipofisaria di LH. Questo si verifica nella resistenza agli androgeni (aumento dei livelli del T e FT con aumento inappropriato dei livelli circolanti di LH), nell'obesità grave (BMI > 38) (riduzione della SHBG circolante e della quota SHBG-T conseguente dell'iperinsulinismo con FT ridotto a causa del mancato compenso della secrezione di LH)<sup>3</sup> e nella vecchiaia (aumento della SHBG circolante a causa del deficit di secrezione del GH con ridotti livelli di FT a causa del mancato compenso della secrezione di LH)<sup>4</sup>.

Al contrario della donna, nel maschio la contribuzione degli androgeni deboli (A, DHEA, DHEAS) agli effetti biologici è trascurabile: infatti, nei soggetti affetti da Addison la virilizzazione è normale, mentre nei maschi agonadici o affetti da ipogonadismo prepuberale si riscontra un evidente ipoandrogenismo senza virilizzazione, nonostante sia conservata la secrezione surrenalica degli androgeni deboli (A, DHEA e DHEAS).

Nelle donne, i livelli plasmatici del T originano sia dalla secrezione diretta della ovaie (cellule interstiziali e tecali) sia dalla conversione periferica degli androgeni deboli (A, DHEA, DHEAS), sia, in piccola parte, dal surrene. Nei tessuti sensibili (cute, fegato, tessuto adiposo ecc) il T è sintetizzato dall'A, DHEA e DHEAS. Tuttavia, una parte di T sintetizzato a livello dei tessuti o passa nel torrente circolatorio o, in gran parte, viene metabolizzato ulteriormente in DHT ad opera della  $5\alpha$  reductasi. Pertanto, i livelli plasmatici del T nella donna non riflettono sempre l'androgenicità a livello tissutale e, inoltre, la produzione periferica di T a partire dagli androgeni deboli non è soggetta al controllo del feedback ipotalamo-ipofisi-ovaie (irsutismo periferico)<sup>5</sup>.

I livelli plasmatici di T nella donna sono solo 1/10 di quelli presenti nell'uomo; circa il 75% è legato alla SHBG, 25% all'albumina e solo 1% è libero (FT). Pertanto, nella donna poiché i livelli plasmatici di SHBG sono in eccesso rispetto a quelli del T, il FT circolante viene sensibilmente modulato dalla variazione della SHBG. Questo è ben evidente nell'obesità androide quando, a causa dell'iperinsulinemia, si ha una riduzione significativa dei livelli plasmatici di SHBG con aumento dei livelli di FT<sup>2</sup>.

## Parametri biologici dell'effetto degli androgeni

Un attendibile marker dell'androgenismo deve riflettere gli effetti del T e dei suoi metaboliti attivi a livello dei differenti tessuti. Sino ad ora, un marker attendibile, pratico e che può essere utilizzato in clinica non esiste. Pertanto, dobbiamo affidarci ai livelli plasmatici degli androgeni che sono solo l'espressione degli eventi che precedono l'attivazione del recettore androgenico, mentre tutti gli altri eventi (attivanti, inibitori e post-recettoriali) che si verificano dopo il legame con il recettore sono difficile da misurare e quantificare. Poiché nel maschio il T è di gran lunga il più importante androgeno, lo stesso T e, soprattutto, la quota non specificamente legata alla SHBG (Alb -T) e quella libera

(FT) sono i migliori parametri dell'attività biologica degli androgeni. Inoltre, non è noto se tutti i tessuti richiedono la stessa quantità di androgeni per effetti androgenici specifici del tessuto (per es. nel maschio per l'attività sessuale sembra che siano richiesti livelli più bassi di T che per gli effetti sul muscolo). A sua volta, la sensibilità tissutale potrebbe influenzare i livelli circolanti del T e questo è evidente sia nell'uomo nelle sindromi da resistenza agli androgeni (S. di Morrison o di Kennedy)<sup>6</sup> che nelle donne con iperandrogenismo ovarico<sup>7</sup>.

Recentemente per la donna è stato proposto come marcatore dell'effetto androgenico l'androstano diolo glucuronide (ADG) circolante. Questo endometabolita è il risultato del metabolismo degli androgeni 5 $\alpha$  riduttasi mediato sia a livello periferico (cute) che, soprattutto, a livello splancnico (fegato). I maggiori precursori dell'ADG nella donna sono gli androgeni deboli del surrene (DHEAS) (nell'uomo il maggior precursore è il T) e, pertanto, i livelli plasmatici di ADG sono aumentati soprattutto quando vi è una ipersecrezione di androgeni surrenali mentre in caso di aumento di livelli circolanti di T, sovente, essi sono normali. Tuttavia, i livelli plasmatici di ADG possono essere aumentati anche in condizioni primitive di aumento di attività della 5 $\alpha$  riduttasi senza iperandrogenismo come si riscontra nell'ipertiroidismo subclinico e conclamato. Pertanto, poiché l'ADG circolante ha un'origine non esclusivamente periferica, poiché rispecchia più i livelli circolanti degli androgeni deboli che del T e poiché può essere aumentato anche nell'ipertiroidismo, l'ADG circolante nella donna non è ritenuto un attendibile marker dell'effetto androgenico<sup>8</sup>.

## Diagnosi dell'iperandrogenismo

La determinazione del T e della sua frazione libera (FT) sono i parametri più attendibili per la diagnosi di iperandrogenismo nella donna o ipogonadismo nell'uomo. Tuttavia, un cruciale problema sono i metodi per misurarli. Se per il maschio i kits in commercio per la determinazione del T hanno una sensibilità in grado di identificare la condizione di ipogonadismo, nella donna i suddetti kits falliscono essendo al di sotto dei limiti di sensibilità. Pertanto, è estremamente importante conoscere i valori normali e la sensibilità del metodo utilizzato che possono essere variabili da laboratorio a laboratorio pur quando si utilizza lo stesso metodo. Quindi, tenendo conto delle manifestazioni cliniche, i dati di laboratorio vanno interpretati<sup>9</sup>. Per le condizioni di ipogonadismo subclinico nel maschio e per le forme di iperandrogenismo nella donna, soprattutto, nelle forme minori o in corso di ipertiroidismo o trattamento con farmaci che aumentano i livelli plasmatici della SHBG (per esempio estroprogestinici) è fondamentale la determinazione del FT. Essa può essere effettuata con il metodo della dialisi o calcolata in maniera pratica, conoscendo la concentrazione del T, SHBG ed albumina<sup>3,9</sup>.

L'iperandrogenismo nel maschio è raro e praticamente si limita ai tumori delle cellule di Leydig, testotossicosi e alla iperplasia surrenalica. Queste forme, nei bambini prepuberi comportano pseudopubertà precoce. Anche nella pubertà precoce è utile misurare il T. In questa ultima situazione la misurazione del FT e Bio-T non appporta ulteriori informazioni. Al contrario nell'ipertiroidismo è utile

misurare sia il T, la SHBG e FT essendo i primi aumentati, mentre il FT risulta normale, indicando una condizione di iperandrogenemia senza iperandrogenismo.

Per quanto riguarda l'iperandrogenismo nella donna, clinicamente si devono distinguere le forme minori (acne, alopecia) dalle forme maggiori (irsutismo e virilismo). Nell'ambito di quest'ultime forme va distinto l'irsutismo che è caratterizzato dalla presenza di una distribuzione della peluria di tipo maschile dal virilismo che comporta una progressiva mascolinizzazione della donna (aumento delle masse muscolari, distribuzione del grasso di tipo maschile, caduta dei capelli, crescita della barba, cambiamento della voce, ipertrofia clitoridea, ecc.). Tenendo conto di quanto suddetto, ci si aspetterebbe valori più elevati di androgeni nella virilizzazione che nell'irsutismo. La determinazione del T permette di evidenziare l'iperandrogenismo e la sede di secrezione. Le cause più frequenti dell'iperandrogenismo sono le forme funzionali: la sindrome dell'ovaio policistico (PCOS) e l'irsutismo periferico. Molto più rare sono le forme organiche come l'iperplasia surrenalica nella forma a comparsa tardiva, i tumori ovarici o surrenalici o la sindrome di Cushing. Anche l'iperprolattinemia è spesso accompagnata da iperandrogenismo con acne e/o irsutismo.

Il più importante ed utile test iniziale è la determinazione del T: valori > 5,5 nmol/L (> 150 ng/dl) in presenza di una rapida comparsa di irsutismo o virilismo depongono per un tumore ovarico; un più moderato aumento del T è indicativo per una PCOS. In questo caso così come nelle altre forme di iperandrogenismo con aumento moderato del T, la SHBG è ridotta significativamente per cui i livelli del FT e del Bio-T possono essere più chiaramente aumentati di quelli del T totale.

Sebbene la clinica (oligo-amenorrea, irsutismo, intolleranza al diabete o franco diabete) possa suggerire con sufficiente precisione la diagnosi di PCOS, la determinazione del T circolante è richiesta per confermare la diagnosi. Le ovaie dei soggetti affetti da PCOS secernono gran quantità di A che è metabolizzato a livello periferico in T così come in estrone.

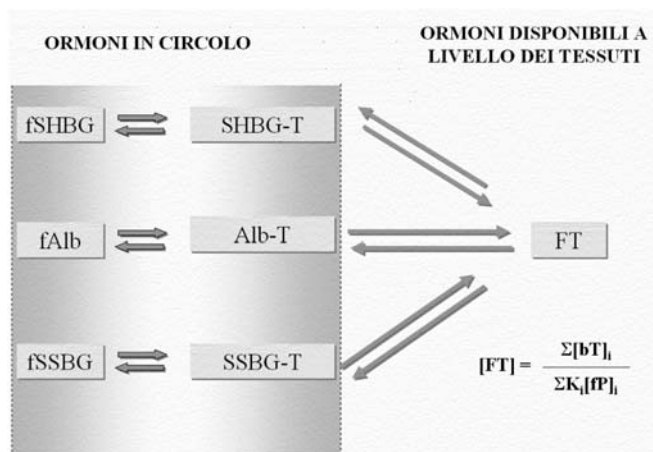
Nelle donne postmenopausali quando si misurano i livelli plasmatici del T bisogna escludere le terapie sostitutive con estrogeni o le forme subcliniche dell'ipertiroidismo: la determinazione secondo la formula di Vermeulen<sup>2</sup> del FT o Bio-T può essere di aiuto nel far diagnosi in quanto i livelli circolanti di quest'ultimi risultano normali pur in presenza di elevati livelli circolanti di SHBG e T.

I tumori surrenalici generalmente secernono una gran quantità di DHEAS, essendo il T circolante moderatamente aumentato come conseguenza dell'aumento della conversione periferica del DHEA.

Le più frequenti forme di iperplasia congenita surrenalica a comparsa tardiva (late-onset) dovute prevalentemente al deficit della 21 beta idrossilasi sono caratterizzate da aumento dei livelli basali circolanti del 17 a idrossiprogesterone (17aOHP) (>3 ng/ml). Tali livelli basali dopo stimolo con ACTH aumentano significativamente superando la soglia di 10 ng/ml<sup>10</sup>.

## Il Laboratorio nella misura degli androgeni

Tra le determinazioni immunometriche quella degli ormoni steroidei, ed in particolare degli androgeni, non ha



**Figura 1.** Legame tra testosterone (T) e proteine di trasporto. ALB=albumina, SHBG=Sex Hormon Binding Globulin, SSBG=Sex Steroid Binding Globulin, FT=testosterone libero, bT=testosterone legato, fp=proteine libere

ancora raggiunto i traguardi analitici desiderati, nonostante la notevole evoluzione della tecnologia degli ultimi anni.

Il primo aspetto è la sensibilità e la ripetibilità delle misure, d'altra parte si deve considerare il livello di concentrazione di questi ormoni mediamente presente nei campioni biologici su cui si effettua la determinazione: se nella donna si confronta con il livello medio di Tiroxina (100 nmol/L) la quantità di T totale è di 5 nmol/L e quello del FT 10 pmol/L.

Un altro aspetto è la specificità richiesta per queste determinazioni: gli ormoni steroidei circolanti sono molteplici e le differenze strutturali si limitano anche ad un solo atomo o tipo di legame. Considerando le piccole dimensioni di queste molecole, esse possono essere determinate solo con metodi competitivi (uso di un solo anticorpo) ed è necessario limitare al massimo la presenza di interferenti nell'ambiente di reazione attraverso procedure di estrazione e purificazione.

La diffusione dei metodi commerciali automatizzati per la determinazione diretta (senza estrazione) del T, se da un lato permette di soddisfare numerose richieste di determinazione in tempi molto brevi, dall'altro non consente di misurare in modo sufficientemente affidabile concentrazioni di T al di sotto di 0,3-0,5 nmol/L. Per questa ragione i metodi commerciali senza estrazione se consentono di misurare in maniera adeguata il livello di T negli uomini, non sono adeguati per le concentrazioni di T nelle donne.

I problemi sono ancora maggiori se si affronta la determinazione della frazione libera in quanto si deve tenere presente che la concentrazione del FT, disponibile a livello dei tessuti, è il risultato di una complessa serie di equilibri dinamici che si instaurano tra le molecole di T e tutte le proteine di trasporto in grado di legare il T stesso. Tra queste proteine quelle che giocano il ruolo predominante sono l'albumina e l'SHBG che legano il 98% del T presente in circolo (Fig. 1).

Gli unici metodi che consentono la determinazione accurata del FT sono quelli basati sulla dialisi all'equilibrio, in quanto separano fisicamente la frazione libera del T da quella legata alle proteine senza alterare gli equilibri di lega-

me. Purtroppo questi metodi sono difficilmente realizzabili nei laboratori di routine in quanto richiedono notevoli capacità tecniche e tempi lunghi.

Le determinazioni di FT, nella maggior parte dei laboratori, viene eseguita con la tecnologia dell'analogo marcato che prevede l'impiego di una molecola (analogo al T) che compete con il T per i siti di legame degli anticorpi utilizzati nel dosaggio immunometrico, ma non si lega (almeno da un punto di vista teorico) alle proteine di trasporto. In realtà, il metodo dell'analogo marcato consente misurazioni sufficientemente affidabili della frazione libera del T quando il quadro proteico del paziente risulta nella norma sia da un punto di vista qualitativo che quantitativo.

La determinazione indiretta del Bio-T o del FT, proposta da vari autori<sup>2,11-13</sup>, si basa sull'estrapolazione della concentrazione del T non legato alle proteine partendo dalla misura della concentrazione del T, dell'SHBG e dell'albumina e considerando le costanti di equilibrio del legame dell'ormone con tali proteine.

Anche la misura dell'SHBG, se effettuata con metodi immunometrici e non con la tecnica di precipitazione con ammonio solfato, può risentire delle problematiche di standardizzazione, quindi di confrontabilità, dei differenti metodi di misura disponibili.

Lo stesso Vermeulen<sup>14</sup> scoraggia l'impiego di metodi diretti, o con l'analogo marcato, per la determinazione del T e raccomanda l'uso di metodi basati sulla dialisi all'equilibrio e sulla precipitazione con ammonio solfato per una corretta valutazione del livello androgenico.

## Conclusioni

La determinazione del T totale e della sua frazione libera FT sono da considerarsi i primi test da utilizzare per confermare la diagnosi dell'iperandrogenismo in ambo i generi.

L'iperandrogenismo nell'uomo è un evento molto raro che nel soggetto prepubere richiede particolare attenzione perché causa pubertà o pseudopubertà precoce e che va distinto da quelle rare forme da resistenza parziale o completa agli androgeni che determinano pseudoermafroditismo.

Nella donna, dopo una attenta valutazione dell'anamnesi e della clinica vanno escluse in primo luogo le forme organiche dell'irsutismo (tumori ovarici o surrenalici e le forme da iperplasia surrenalica, iperprolattinemia, S. di Cushing) con la determinazione dei livelli plasmatici di T, 17aOHP, DHEAS, prolattina e cortisolo. Tuttavia, la misurazione del T resta il test più utile nelle forme funzionali (PCOS) o minori (acne, alopecia). Tutte le volte che i livelli plasmatici del T sono lievemente aumentati o normali in presenza di irsutismo medio o lieve e/o acne e/o alopecia, la determinazione della SHBG e FT (anche calcolato con la formula di Vermeulen) potrebbe ritornare utile per la diagnosi di iperandrogenismo funzionale.

## Bibliografia

1. Rommerts FFG. Testosterone: an overview of biosynthesis, transport, metabolism and non-genomic action. In: Niesschlag E, Behre HM eds Testosterone. Action-Deficiency-Substitution. Cambridge: University Press; 2004. p. 1-37.
2. Vermeulen A, Verdonck L, Kaufman JM. A critical evaluation

- of simple methods for the estimation of free testosterone in serum. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:3666-72.
3. Giagulli VA, Kaufman JM, Vermeulen A. Pathogenesis of the reduced androgen levels in obese men. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79:997-1000.
  4. T'Sjoen GG, Giagulli VA, Delva H, Crebbe P, De Becquer D, Kaufman JM. Comparison assessment in young and elderly men of the gonadotropin response to aromatase inhibition. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90:5717-21.
  5. Alloio B, Arlt W. Dehydroepiandrosterone (DHEA) and Androstenedione. In: Niesschlag E, Behre HM eds *Testosterone. Action-Deficiency-Substitution*. Cambridge: University Press; 2004. p. 597-622.
  6. Klocker, Gromoll J. The androgen receptor: molecular biology. In: Niesschlag E, Behre HM eds *Testosterone. Action-Deficiency-Substitution*. Cambridge: University Press; 2004. p. 39-92.
  7. Ibanez L, Ong KK, Mongan N, Jaaskelain J, Marcos MV, Hughes IA, et al. Androgen receptor gene CAG repeat polymorphisms in the development of ovarian hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:3333-8.
  8. Vermeulen A, Giagulli VA. Physiopathology of plasma androstenediol glucuronide. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1991; 39:829-33.
  9. Rosner W, Auchus RJ, Azziz R, Sluss PM, Raff H. Position statement: utility, limitations, and pitiful in measuring testosterone: an Endocrine Society Position Statement. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92:405-13.
  10. Azziz R, Sanchez LA, Knochenhauer ER, Moran C, Labeniz J, Stephen KC, et al. Androgen excess in women: experience with over 1000 consecutive patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:453-62.
  11. Ly LP, Handelsman DJ. Empirical estimation of free testosterone from testosterone and sex hormone-binding globulin immunoassays. *European Journal of Endocrinology* 2005; 152:471-78
  12. Giton F, Fiet J, Guéchet J, Ibrahim F, Bronsard F, Chopin D, et al. Serum bioavailable testosterone: assayed or calculated?. *Clin Chem* 2005; 52,3:474-81.
  13. De Ronde W, Van der Schouw YT, Pols HAP, Gooren LJG, Muller M, Grobbee DE, et al. Calculation of bioavailable and free testosterone in men: a comparison of 5 published algorithms. *Clin Chem* 2006; 52,9:1777-84.
  14. Vermeulen A. Hormonal cut-offs of partial androgen deficiency: a survey of androgen assays. *J Endocrinol Invest* 2005; 28(3 Suppl):28-31.